

UNTERSUCHUNGEN ÜBER
DIE AMMONIUM- UND HARNSTOFFKONZENTRATION IM BLUT
BEI LEBERCIRRHOSE

VON

DORIS FEY

1967



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554814_0011

Aus der II. Medizinischen Klinik und Poliklinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. P. Schölmerich

UNTERSUCHUNGEN ÜBER
DIE AMMONIUM- UND HARNSTOFFKONZENTRATION IM BLUT
BEI LEBERCIRRHOSE

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

DORIS FEY

aus Mannheim

MAINZ 1967

Dekan: Professor Dr. L. Diethelm
Referent: Professor Dr. W. Gerok
Korreferent: Professor Dr. P. Schölmerich
Tag der mündlichen Prüfung: 16. Dezember 1967



Gesamtherstellung:

Ditters Bürodienst Mainz

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Fragestellung	3
III. Methodik	5
1. Ammoniumbestimmung	5
A. nach KIRSTEN und Mitarb.	5
B. nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ	7
2. Harnstoffbestimmung	8
nach SCOTT und FAWCETT	
3. Statistische Methoden	9
IV. Ergebnisse	12
V. Diskussion	15
VI. Zusammenfassung	19
VII. Literatur	21

I. EINLEITUNG

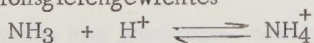
In jeder Zelle wird Ammonium ^{*}) bei der Desaminierung der verschiedenen Aminosäuren und Amine fortwährend gebildet, ebenso beim Abbau der N-haltigen Purinbasen Guanin und Adenin. In der Niere entsteht Ammonium aus Glutamin. Es wird zur Regulierung des Säuren-Basenhaushaltes in den Urin, aber auch ins Nierenvenenblut abgegeben. Ferner wird Ammonium im Darm durch bakteriellen Abbau von N-haltigen Nahrungssubstanzen und Harnstoff produziert.

Ammonium wirkt in höheren Konzentrationen toxisch, vor allem auf das Zentralnervensystem. Es führt zu motorischer Unruhe, zu Krämpfen und schließlich zu Bewußtlosigkeit. Eine ständige Ammoniakentgiftung ist daher notwendig, um den Blutspiegel niedrig zu halten. Eine sofortige "vorläufige" Entgiftung kann in jeder Zelle stattfinden. Sie kann erfolgen:

- a) durch Ammoniumbindung an Glutamin- und Aspariginsäure. Es entstehen die Säureamide Glutamin und Asparagin. Sie erfüllen Transportfunktion für das Ammonium zur Leber (WEIL-MALHERBE),
- b) durch die unterschiedliche Permeabilität von Ammoniak und Ammoniumionen. Ammoniak passiert die Zellmembranen rasch, Ammoniumionen passieren sie praktisch nicht. Die Permeabilität ist also abhängig von der Dissoziation, die wiederum vom pH abhängt. Anstieg des pH im Blut (Alkalose) führt zur Zunahme des Ammoniaks im Gewebe und zur Abnahme im Blut. Eine Acidose wirkt umgekehrt (MOORE und Mitarb.; JACOBS),
- c) durch Einbau des Ammoniaks bei der Harnsäuresynthese. Diese Möglichkeit der Entgiftung ist von untergeordneter Bedeutung, ebenso die Ausscheidung über die Niere.

Die definitive Ammoniumentgiftung erfolgt im KREBS-HENSELEIT-Cyclus der Leber. Ammonium wird dabei in Harnstoff übergeführt.

^{*}) Als "Ammonium" wird im folgenden stets die Summe des nicht dissoziierten Ammoniaks (NH_3) und des Ammoniumions (NH_4^+) bezeichnet, da auf Grund des Reaktionsgleichgewichtes



in der Regel beide Komponenten vorhanden sind.

BIOCHEMIE DER HARNSTOFFSYNTHESE (Abb. 1)

KREBS und HENSELEIT vermuteten erstmals, daß es sich bei der Harnstoffsynthese um einen cyclischen Prozeß unter Beteiligung von Ornithin und Citrullin handeln müsse. Diese Vermutung wurde durch die Beobachtung gestützt, daß Citrullin und Ornithin in Gegenwart von Ammonium die Harnstoffsynthese wesentlich beschleunigen, ohne selbst verbraucht zu werden. In der Folgezeit brachten Untersuchungen mit isotopenmarkierten Aminosäuren die Bestätigung (FORSTER und SCHÖNHEIMER) des von KREBS und HENSELEIT formulierten Reaktionscyclus der Harnstoffsynthese.

Die Synthese des Harnstoffs erfolgt in verschiedenen Schritten (Abb. 1). Unter Energieverbrauch verbinden sich in einer komplexen Reaktion zunächst Ammoniak und Kohlendioxyd zu Carbamylphosphat (GRISOLIA und COHEN; GRISOLIA und MARSHALL). N-Acetylglutamat spielt bei dieser Reaktion eine bislang ungeklärte Rolle (GRISOLIA und Mitarb.; HALL und COHEN). Der genaue Ablauf des Reaktionskomplexes ist gleichfalls noch unbekannt. Carbamylphosphat wird nun in den eigentlichen Cyclus eingeschleust. Es reagiert mit Ornithin unter Bildung des Citrullins. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym Ornithintranscarbamylase (Übersicht der Enzyme Abb. 1). Der nächste Schritt, die Reaktion von Citrullin mit Aspariginsäure, ist die limitierende Reaktion im Harnstoffcyclus. Als Enzym ist die Argininosuccinatsynthetase, das "cleaving enzyme", in Fumarsäure und Arginin gespalten (RATNER; DAVISON und ELLIOT). Zuletzt schließlich erfolgt die hydrolytische Spaltung des Arginins in Ornithin und Harnstoff. Als Enzym ist die Arginase wirksam, die außer in der Leber auch noch in anderen Organen nachgewiesen werden konnte. Der entstandene Harnstoff wird zum größten Teil über die Niere ausgeschieden, während Ornithin der Harnstoffsynthese erneut zur Verfügung steht.

In letzter Zeit wurden Fälle von angeborenen Enzymdefekten in diesem Reaktionscyclus mitgeteilt (RUSSELL und Mitarb.). McMURRAY berichtete von einem Fall, bei dem eine angeborene Citrullinurie bestand. Es kam zu einem Anstieg des Blutammoniumspiegels und zum Coma. Die gleiche Beobachtung konnte COLOMBO bei einem Neugeborenen machen. Hier handelte es sich um die kompetitive Hemmung der Arginase durch die basische Aminosäure Lysin. Ein Anstieg des Blutammoniumspiegels und Coma hepaticum waren die Folgen.

Für Ammoniumstoffwechsel und -entgiftung sind neben diesen Untersuchungen auch solche von Bedeutung, die Stoffwechselvorgänge untersuchen, die zu

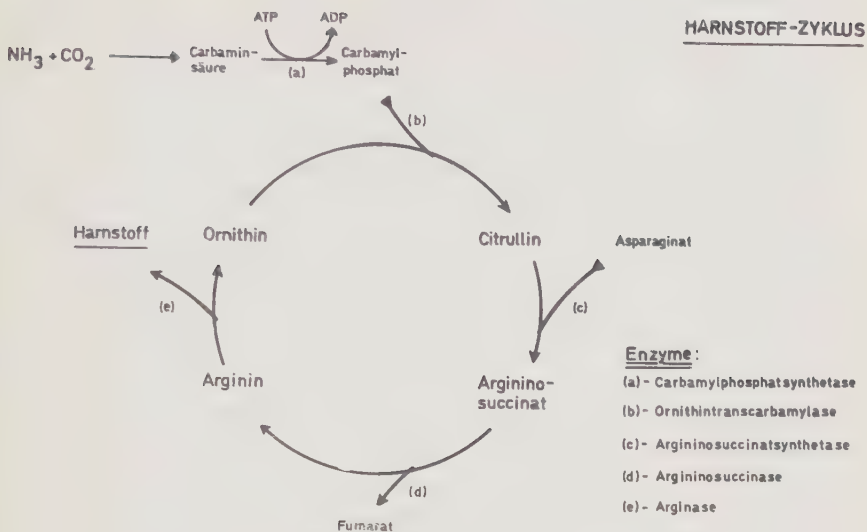


Abb. 1:

Der Harnstoffcyclus.

Die beteiligten Enzyme sind rechts unten aufgezeichnet.

einer Steigerung der Harnstoffsynthese führen. Schon früher konnte gezeigt werden, daß der N-Stoffwechsel hormonell beeinflußt wird. Bekannt ist z. B., daß einige Hormone zu einer N-Retention führen, während normalerweise N-Aufnahme und -Ausscheidung im Gleichgewicht stehen. Wachstumshormon und Insulin führen im Tierversuch bei der adrenaletomierten und hypophys-ektomierten Ratte zu keiner Änderung des Aminosäurespiegels im Blut. Hingegen kommt es zu einer deutlichen Senkung durch Gaben von Nebennieren-rindenhormon. Die Tatsache, daß der Stickstoff nach Desaminierung der Aminosäuren über den Harnstoffcyclus zur Ausscheidung gelangt, läßt erwarten, daß es auch zu Aktivitätsänderungen der am Cyclus beteiligten Enzyme kommt. Das konnte in neueren Arbeiten tatsächlich bestätigt werden. So fanden McLEAN und McGURNEY bei allen fünf am KREBS-HENSELEIT'-Cyclus beteiligten Enzymen eine Aktivitätsminderung nach Adrenaletomie bei der Ratte. Vermindert waren vor allem die Aktivitäten der Argininosuccinats-synthetase und der Arginase. Eine Normalisierung erfolgte durch Gaben von Cortison. Am besten sprach die Arginase an. Beim normalen, nicht adrenal-ektomierten Tier steigerte Cortison sogar die Enzymaktivitäten über diejeni-gen der gesunden Kontrolltiere. Diese Untersucher fanden auch, daß Wachs-tumshormon im Arginin-Synthetase-System zur Aktivitätsabnahme führte.

NAZARIO und COHEN konnten an der thyreodektomierten Ratte keine Aktivi-tätsminderung der Carbamylphosphat-Synthetase, der Ornithintranscarbamy-lase und Arginase nachweisen. Ein Mangel an Thyroxin ließ die Enzymaktivi-täten also unverändert, lediglich die Leberregeneration war vermindert. SCHIMKE fand, daß die Enzymaktivitäten aller am Harnstoffcyclus beteilig-ten Enzyme der täglichen Eiweißaufnahme direkt proportional sind. Er konn-te weiter zeigen, daß eine proteinfreie Diät zu einer Abnahme des Enzymge-haltes in der Leber führte. Bei hungernden Tieren, die ihren Energiebedarf mit körpereigenem Eiweiß decken mußten, konnte er einen Aktivitätsanstieg nachweisen. Die Enzymaktivitäten standen in Relation zu der Harnstoffaus-scheidung und nicht zum Gesamtproteingehalt der Leber.

II. FRAGESTELLUNG

Mit verschiedenen Methoden der Ammoniumbestimmung ist nachgewiesen worden, daß bei Erkrankungen der Leber, besonders bei Lebercirrhose, die Ammoniumkonzentration im Blut erhöht ist. Diese Zunahme der Ammonium-konzentration ist wahrscheinlich wichtiger Teilfaktor bei der Entstehung des Coma hepaticum. Da die Angaben über das Ausmaß der Ammoniumzunahme

im Blut bei Lebercirrhose stark schwanken und da die bisherigen Resultate teilweise mit Methoden gewonnen wurden, die einer strengeren Kritik nicht standhalten, erschien es angebracht, diese Fragen erneut zu überprüfen. Dabei sollten auch Aufschlüsse über die arterielle und venöse Ammoniumkonzentration und über den Harnstoffspiegel gewonnen werden, um die Ursachen der erhöhten Ammoniumkonzentration im Blut bei Lebercirrhose zu klären.

Es wurde deshalb bei 10 Gesunden und 10 Kranken mit Lebercirrhose die Ammonium- und Harnstoffkonzentration im gleichzeitig entnommenen arteriellen und venösen Blut bestimmt. Die Untersuchungen wurden außerdem 45 Minuten nach peroraler Gabe von 5 Gramm Ammoniumacetat durchgeführt. Durch diese "Ammoniumbelastung" sollte die Entgiftungsfunktion der Leber möglichst stark in Anspruch genommen und eine Einschränkung dieser Funktion besonders deutlich werden. Für die Bestimmung der Ammoniumkonzentration wurden zwei Methoden, die auf verschiedenen Prinzipien beruhen (Farbreaktion und enzymatischer Test) angewandt, um möglichst zuverlässige Resultate zu erhalten.

Folgende Fragen sollten hierdurch geklärt werden:

1. Bestehen zwischen den Resultaten der beiden Ammoniumbestimmungsmethoden signifikante Unterschiede?
Worauf sind sie zurückzuführen?
2. Bestehen zwischen Gesunden und Kranken mit Lebercirrhose signifikante Unterschiede der Ammoniumkonzentration im Blut bzw. der Harnstoffkonzentration im Blutplasma?
3. Ist bei Gesunden oder Kranken mit Lebercirrhose eine signifikante arterio-venöse Differenz der Ammonium- und Harnstoffkonzentration nachweisbar?
4. Verursacht die perorale Gabe von 5 g Ammoniumacetat bei Gesunden oder Cirrhosekranken eine signifikante Zunahme der Ammonium- oder Harnstoffkonzentration und ist diese Zunahme im arteriellen und venösen Blut gleich ausgeprägt?

III. METHODIK

1. AMMONIUMBESTIMMUNG

Zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration im Blut fanden bisher Methoden Verwendung, die Ammonium nur indirekt bestimmten. Eine Übersicht über diese Methoden gibt die nachfolgende Zusammenstellung (nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ - dort sind auch weitere Literaturhinweise aufgeführt).

I. Ammoniumbestimmung nach Austreiben aus der Probe:

- a) Isolierung:
 - a. Destillationsverfahren
(Übersicht bei STANOJEVIC)
 - b. Aerationsverfahren
(VAN SLYKE und HILLER)
 - c. Diffusionsverfahren
(CONWAY; BORSOOK)
- b) Quantitative Bestimmung des isolierten Ammoniums:
 - a. durch Rücktitration
(CONWAY)
 - b. colorimetrisch nach Farbreaktion
(SELIGSON und HIRAHARA;
VAN SLYKE und HILLER;
TERNBERG und HERSHEY)

II. Ammoniumbestimmung nach Adsorption an einen Ionenaustauscher, anschließend Elution und quantitative Bestimmung durch Colorimetrie (DIENST; MILLER und RICE; FORMAN).

Neuere Methoden der Ammoniumbestimmung erlauben eine direkte Bestimmung in der Probe ohne vorherige Isolierung. Bei den beiden hier angewandten Methoden handelt es sich um solche Verfahren (KIRSTEN und Mitarb.; MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER).

A. Enzymatische Ammoniumbestimmung nach KIRSTEN und Mitarb.

Prinzip: NH_4^+ ist Substrat einer enzymatischen Reaktion:



Diese Reaktion wird katalysiert durch das Enzym Glutamatdehydrogenase. Das Reaktionsgleichgewicht ist vorwiegend nach links verlagert. Reduziertes Diphosphopyridinnucleotid zeigt bei einer Wellenlänge zwischen 300 und 400 nm eine Absorption. Bei Ablauf der Reaktion entsprechend ihrem Gleichgewicht wird NH_4^+ verbraucht und aus dem reduzierten Diphosphopyridinnucleotid entsteht die oxydierte Form. Diese zeigt in diesem Wellenlängenbereich keine Absorption. Der Reaktionsablauf läßt sich als Extinktionsabnahme verfolgen. Die Abnahme der Extinktion ist dabei nicht nur ein Maß für das neu gebildete NAD, sondern gleichzeitig ein Maß für das verbrauchte und damit in der Probe anwesende NH_4^+ .

Reagentien und Geräte:

- 1) Ionenaustauschersäule
DOWEX 50 x 8 (H^+ -Form)
- 2) Tris-Acetat-Puffer; pH: 8,6 (0,12 M)
- 3) Reagentien zur Ammoniumbestimmung nach KIRSTEN-GEREZ
 - a) α -Ketoglutar säure (0,08 M) BOEHRINGER
 - b) reduziertes Diphosphopyridinnucleotid
BOEHRINGER
 - c) Glutamatdehydrogenase BOEHRINGER
(frei von Ammoniumionen)
 - d) 20%ige Trichloressigsäure
 - e) 6 N Natronlauge
- 4) Universal-Indikatopapier MERCK

Die Messung der Extinktionsabnahme erfolgte in einem Photometer EPPENDORF mit angeschlossenem Schreiber. Der Cuvettenhalter war temperierbar (25°C).

Durchführung:

Die Lösungen wurden mit Aqua bidest. angesetzt, welches nach Passage einer Ionenaustauschersäule nahezu frei von Ammoniumionen war. Eine Probe davon wurde jeweils nach den noch zu beschreibenden Methoden zur Ammonium- bzw. Harnstoffbestimmung (MÜLLER-BEISSENHIRTZ; FAWCETT und SCOTT) auf ihre Reinheit geprüft.

Bei Verwendung des Phosphatpuffers pH: 7,6, wie er in der Arbeit von KIRSTEN und Mitarb. angegeben ist, streuten die Werte stark. Es wurde daher Tris-Acetat-Puffer pH: 8,6 verwendet (TALKE und SCHUBERT).

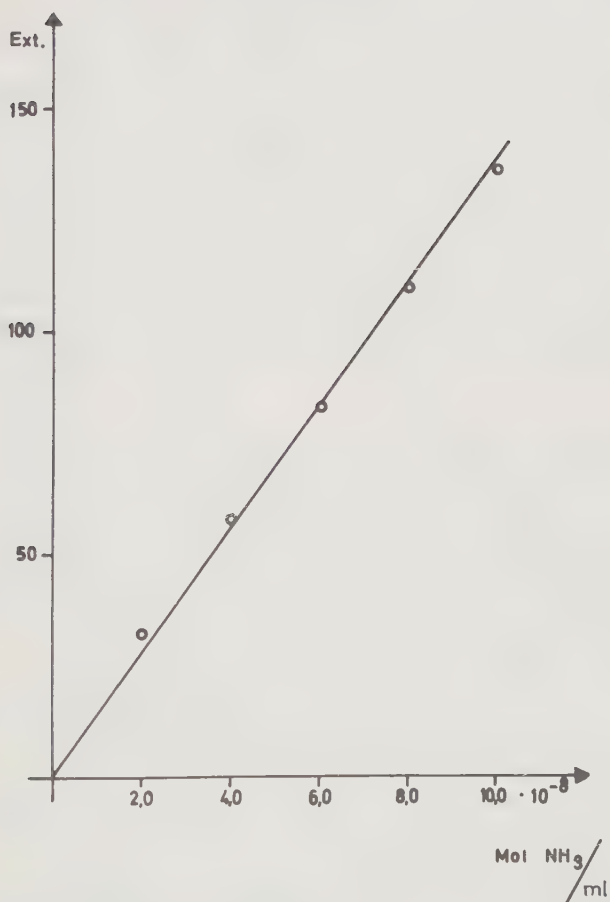


Abb. 2:

Ammoniumbestimmung nach KIRSTEN und Mitarb.
Die Extinktion ist eine lineare Funktion der
Ammoniumkonzentration.

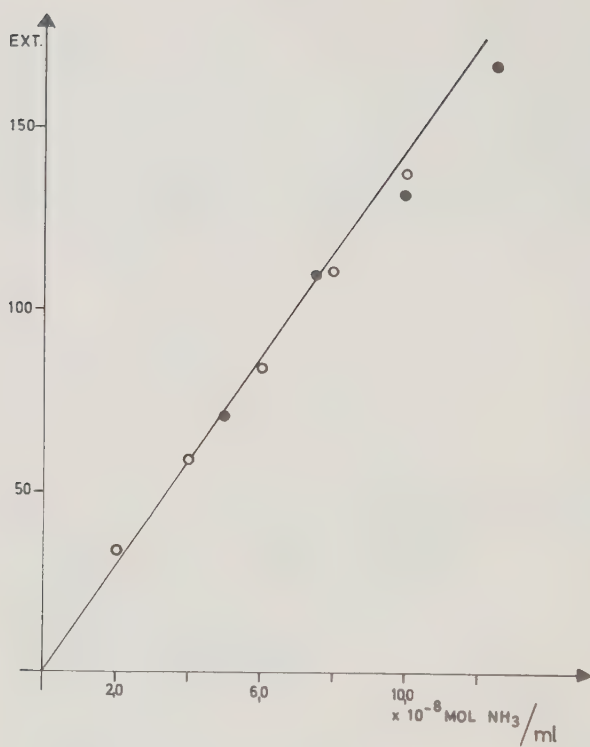


Abb. 3:

Ammoniumbestimmung nach KIRSTEN und Mitarb.

In der Abbildung sind die Werte der vorangehenden Abbildung wiedergegeben.

Die schwarzen Wertepunkte zeigen die Extinktionen, die nach Zusatz einer definierten Menge Ammoniumacetat zum Blutserum gemessen wurden.

Das mit 20%iger Trichloressigsäure enteiweißte Blut wurde, ebenso wie die α -Ketoglutar säure, unter "Tüpfeln" auf MERCK-Indikatorpapier neutralisiert.

Die Testmischung wurde nach Vorschrift bereitet.

0,5 ml des enteiweißten und neutralisierten Serums wurden mit 1,58 ml der Testmischung in einer Quarzcuvette gemischt, die in einem temperierbaren Cuvettenhalter stand (25°C). Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 366 nm in einem Photometer EPPENDORF, dem ein Registriergerät angeschlossen war. Die Skala des Schreibers wurde mit dem Faktor 4 gespreizt.

Nach einem Vorlauf von 5 Minuten wurden 20 μ l des Enzyms Glutamatdehydrogenase mit einer Mikropipette (NETHELER und HINZ, Hamburg) zugegeben. Die Reaktion sollte nach den Angaben von KIRSTEN und Mitarb. nach 20 Minuten beendet sein. Nach unserer Beobachtung reichte diese Zeit nicht aus, es waren 30-35 Minuten erforderlich. Nach dieser Zeit wurde der Endwert abgelesen.

Bei Ammoniumbestimmung an Ammoniumsulfatlösungen abgestufter Konzentration ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen der Extinktionsdifferenz und der Ammoniumkonzentration in der untersuchten Probe (Abb. 2).

Wurde die Ammoniumbestimmung im Serum vor und nach Zusatz einer bekannten Ammoniumacetatmenge ausgeführt, so konnte die zugesetzte Ammoniummenge wiedergefunden werden (Abb. 3).

B. Direkte colorimetrische Ammoniumbestimmung nach MÜLLER-BEISENHIRTZ und Mitarbeiter

Es handelt sich, ebenso wie bei der zuvor beschriebenen Methode, um ein Verfahren, bei dem Ammonium ohne vorherige Isolierung direkt in der Probe bestimmt wird.

Prinzip: Das in der Probe vorhandene Ammonium reagiert bei einer Temperatur von 37°C mit Phenol und Hypochlorit, die in definierten Mengen zugesetzt werden. Es bildet sich ein blauer Farbstoff mit einem Absorptionsmaximum bei 623 nm. Die Intensität des Farbstoffes ist der Ammoniumkonzentration proportional. Es gilt das LAMBERT'-BEER'sche Gesetz; die Extinktion ist eine lineare Funktion der Ammoniumkonzentration. Der Mechanismus, der der Farbstoffbildung zugrunde liegt, ist noch unbekannt, ebenso die Chemie des Farbstoffes. Man nimmt an, daß Phenol in Anwesenheit von Ammonium zu Chinonimin oxydiert wird, welches durch Kondensation den blauen Farbstoff bildet (FÜRTH, FRIEDRICH und SCHOLL).

Die Methode wurde in folgender Weise abgeändert:

An Stelle der in der Methode angeführten Phenol- und Hypochloritlösungen wurden diese Reagentien der "BIOCHEMICA-TEST-KOMBINATION" zur Harnstoffbestimmung der Firma BOEHRINGER Mannheim entnommen. Die Konzentration des Hypochloritreagens aus der Testpackung entsprach nicht derjenigen nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ, es wurden daher noch 2,5 g NaOH und 45,0 g Dinatriumhydrogenphosphat je 500 ml zugesetzt.

Durchführung: Das zu analysierende Serum wurde sofort nach Entnahme mit eisgekühlter 20%iger Trichloressigsäure enteiweißt. Anschließend wurde zentrifugiert und 0,5 ml vom Überstand mit 2 ml Phenol- und 2 ml Hypochloritreagens versetzt und gemischt. Dann wurden die Ansätze für 30 Minuten in ein Wasserbad von 37°C gegeben. In dieser Zeit entwickelte sich der blaue Farbstoff.

Dann erfolgte die Messung der Extinktionen bei 578 nm im Photometer EPPENDORF bei einer Schichtdicke von 1 cm gegen Wasser. Die Messung erfolgte also bei einer Wellenlänge von 578 nm, obwohl das Extinktionsmaximum - wie oben angeführt - bei 623 nm liegt. Diese Wellenlänge wurde gewählt, da nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ die Meßergebnisse in diesem Bereich besser reproduzierbar sind. Die Ammoniumkonzentration der Serumprobe errechnete sich aus deren Extinktion, die ins Verhältnis gesetzt wurden zu der Extinktion einer Standardlösung.

Bei Ammoniumbestimmung an Ammoniumsulfatlösungen abgestufter Konzentration ergibt sich eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Ammoniumkonzentration in der untersuchten Probe. (Abb. 4).

2. BESTIMMUNG VON HARNSTOFF NACH FAWCETT UND SCOTT

Bei dieser Methode handelt es sich um eine enzymatische Bestimmung des Harnstoffes. Modifikationen der Methode waren nicht erforderlich.

Prinzip: Harnstoff kann in Ammoniumcarbonat gespalten werden. Die Reaktion wird katalysiert durch das Enzym Urease. Das Ammoniumcarbonat dissoziiert. Die anfallenden Ammoniumionen reagieren mit Phenol und Hypochlorit. Dieser Teil der Reaktion entspricht der zuvor beschriebenen Methode der Ammoniumbestimmung nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ. Es bildet sich der gleiche blaue Farbstoff, dessen Extinktion der Ammonium- und damit der Harnstoffkonzentration proportional ist.

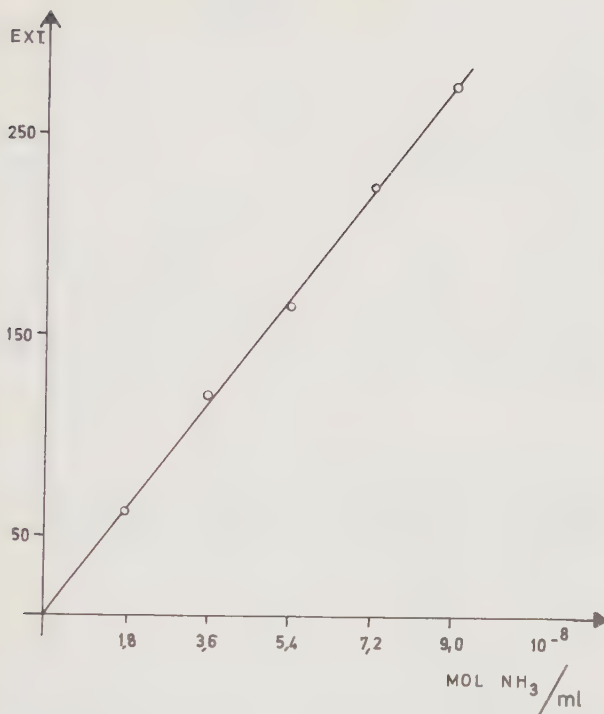


Abb. 4:

Ammoniumbestimmung nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER.
Die Extinktion ist eine lineare Funktion der Ammonium-
konzentration.

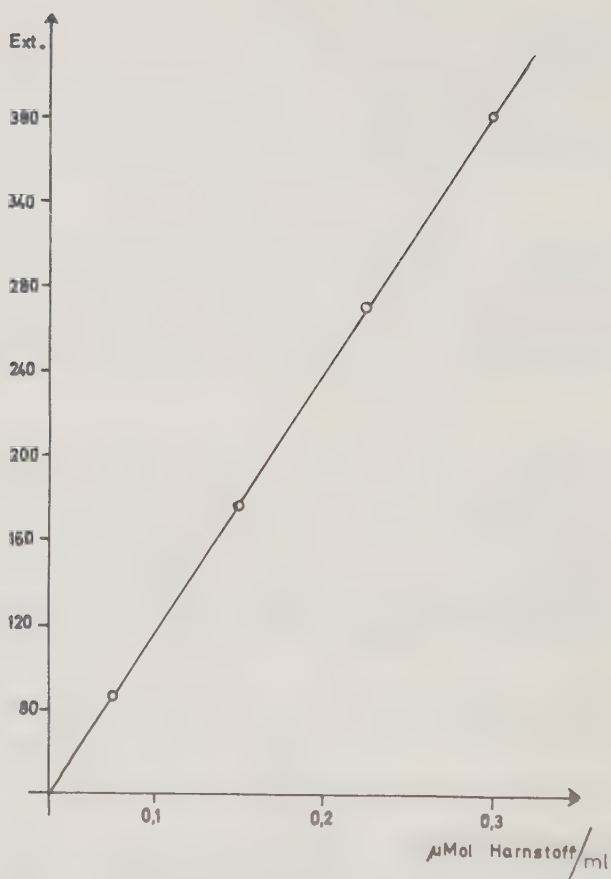


Abb. 5:

Harnstoffbestimmung nach FAWCETT und SCOTT.

Lineare Beziehung zwischen Extinktion und Harnstoffkonzentration.

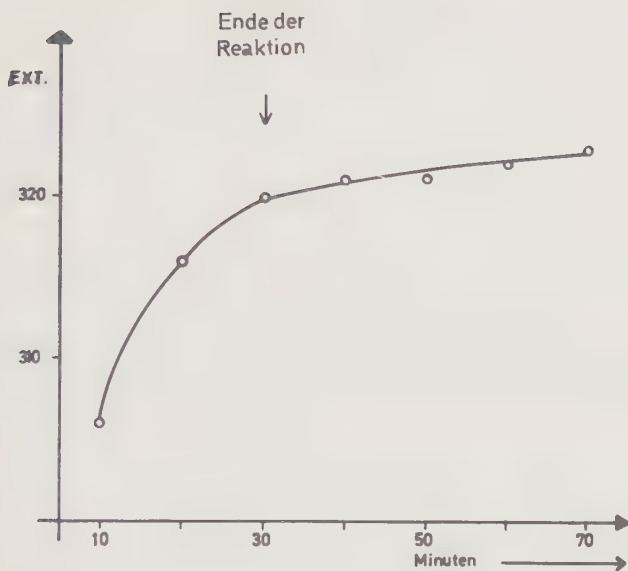
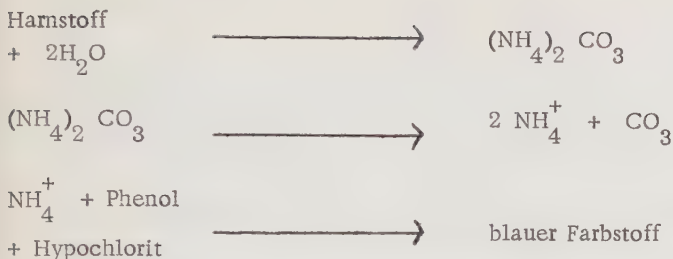


Abb. 6:

Prüfung der Stabilität des gebildeten Farbstoffes.
Die Extinktionsmessung erfolgte in Zeitabständen von
10 Minuten.



Die Extinktion des Farbstoffes wurde mit einem Filter S 546 nm bei einer Schichtdicke von 1 cm im Photometer EPPENDORF gemessen.

Zur Eichkurve wurden Verdünnungen einer 3 mM Harnstofflösung verwendet. Dabei ergab sich eine lineare Beziehung zwischen Extinktion und Harnstoffkonzentration (Abb. 5).

Die Patientenserum wurden 1:10 verdünnt.

Die Berechnung der Harnstoffkonzentration erfolgt durch Vergleich der gemessenen Extinktion mit der Extinktion einer Standard-Harnstofflösung.

Die Haltbarkeit des gebildeten Farbstoffes wurde in verschiedenen Zeitabständen nach Beendigung der Reaktion geprüft. Der gebildete Farbstoff erwies sich als stabil (Abb. 6).

3. STATISTISCHE METHODEN

Die Berechnung der Häufigkeitsverteilung erfolgte mit nachfolgenden Größen. Die ermittelten Werte sind aus den Tabellen II, IV, VII, IX ersichtlich.

Mittelwert:
$$\bar{x} = \frac{\sum_i x_i}{n}$$

Standardabweichung:
$$s = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Standardabweichung des Mittelwertes:
$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{\sqrt{n}} = \sqrt{\frac{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}{n(n - 1)}}$$

Folgende Fragen waren statistisch zu überprüfen:

1. Bestehen zwischen den mit den verschiedenen Methoden (enzymatische Methode nach KIRSTEN und Mitarb. und direkt colorimetrische Methode zur Ammoniumbestimmung nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ) ermittelten Mittelwerten der Ammoniumkonzentration Unterschiede?
2. Stimmen die Mittelwerte der Ammonium- und Harnstoffkonzentration bei Gesunden und Kranken mit Lebercirrhose überein?
3. Stimmen die Mittelwerte der Ammonium- und Harnstoffkonzentration im arteriellen und venösen Blut überein?
4. Ist nach der Belastung mit 5 g Ammoniumacetat bei den gesunden Kontrollpersonen oder den Kranken mit Lebercirrhose eine Zunahme der Ammonium- oder Harnstoffkonzentration zu beobachten?

Ist eine Zunahme der Ammonium- bzw. Harnstoffkonzentration nach Belastung im arteriellen und venösen Blut gleich ausgeprägt? Kann eine Wechselwirkung nachgewiesen werden?

Die angeführten Hypothesen wurden mittels der mehrfachen Varianzanalyse überprüft. Die Varianzanalyse ermöglichte neben dem Vergleich der Mittelwerte die Beurteilung von Wechselwirkungen, d.h. ob die venösen und arteriellen Mittelwerte der Ammoniumkonzentration sich nach der Belastung in gleicher Weise ändern oder ob zum Beispiel der arterielle Wert stärker ansteigt als der venöse Wert.

Im ersten Fall ergibt sich keine gesicherte Wechselwirkung, im zweiten Fall ist eine Wechselwirkung nachweisbar.

Im folgenden ist ein Beispiel der durchgeführten Varianzanalyse aufgezeichnet. Es handelt sich um die Ammoniumkonzentration im Blut der gesunden Kontrollpersonen.

Ursache der Varianz	Freiheits- grade	SAQ ^{*)}	MAQ ⁺⁾	F-Test	F	F _{0,01}	F _{0,05}	P
1. Versuchspersonen	9	523.439	58.159	MAQ ₁ /MAQ _{Rest}	5,263	5,35	3,18	=0,01
2. vor und nach der Belastung	1	101.124	101.123	MAQ ₂ /MAQ ₁₂	20,658	10,60	5,12	0,01
3. arterio-venös	1	7.569	7.569	MAQ ₃ /MAQ ₁₃	0,725	10,60	5,12	- - -
12. Versuchsp. vor u. nach Belastung	9	44.056	4.895	MAQ ₁₂ /MAQ _{Rest}	0,443	5,35	3,18	- - -
13. Versuchspersonen arterio-venös	9	93.970	10.441	MAQ ₁₃ /MAQ _{Rest}	0,945	5,35	3,18	- - -
23. Belastung arterio-venös	1	32.400	32.400	MAQ ₂₃ /MAQ _{Rest}	2,932	10,60	5,12	- - -
Rest	9	99.439	11.048	- - - - -	- - -	- -	- -	- - -
Total	39	901.997						

*) SAQ = Summe der Abweichungsquadrate

+) MAQ = mittleres Abweichungsquadrat

Abb. 7: Mehrfache Varianzanalyse
Gruppe der gesunden Kontrollpersonen. Ammoniumbestimmung

IV. ERGEBNISSE

Bei zehn Gesunden und zehn Kranken mit Lebercirrhose wurden Ammonium und Harnstoff jeweils vor und nach Ammoniumacetatbelastung mit den angegebenen Methoden bestimmt. Den untersuchten Personen wurde zunächst morgens nüchtern arterielles und venöses Blut entnommen. Danach wurden 5 Gramm Ammoniumacetat in ca. 150 ml Wasser gelöst und den Patienten peroral verabreicht. 45 Minuten nach der peroralen Gabe des Ammoniumacetats wurde erneut venös und arteriell Blut entnommen. Die Ammonium- und Harnstoffbestimmungen erfolgten unmittelbar nach der Blutentnahme.

Nach den angegebenen statistischen Methoden wurden die arteriellen und venösen Nüchternwerte innerhalb einer Gruppe zunächst miteinander verglichen, derselbe Vergleich wurde mit den Belastungswerten angestellt.

Schließlich wurden die analogen Werte der beiden Gruppen zueinander in Beziehung gesetzt.

1. GESUNDE

Es wurden zehn gesunde Kontrollpersonen untersucht, bei denen zur Zeit der Untersuchung kein Anhalt für eine Erkrankung der Leber bestand, auch anamnestisch ergab sich hierfür kein Hinweis. Die Leberfunktionsproben erbrachten normale Werte.

Ammonium

Die mit der enzymatischen (KIRSTEN u. Mitarb.) und der direkt colorimetrischen (MÜLLER-BEISSENHIRTZ und KELLER) bei den gesunden Kontrollpersonen vor und nach Belastung gemessenen Ammoniumkonzentrationen sind in Tab. 1 aufgeführt. Mittelwert ($\bar{x}$), Streuung (s) und Streuung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) der Werte, die am venösen und arteriellen Blut jeweils vor und nach Belastung gemessen wurden, sind in Tabelle II enthalten.

Die statistische Prüfung ergibt, daß bei den gesunden Kontrollpersonen zwischen der arteriellen und venösen Ammoniumkonzentration weder vor noch nach Belastung ein gesicherter Unterschied der Ammoniumkonzentration besteht. Statistisch auffällig ist, daß die venöse Ammoniumkonzentration nach Ammoniumacetatbelastung geringer ist als vor Belastung.

NAME		Methode KIRSTEN		Methode BEISSENHIRTZ	
		vor Belastung	nach Belastung	vor Belastung	nach Belastung
1.FR.W.	art.	11,8	13,1	8,5	7,3
	ven.	9,3	13,0	8,2	6,0
2.PO.L.	art.	9,5	13,0	4,0	3,3
	ven.	18,7	9,4	2,8	1,7
3.DÖ.I.	art.	12,6	8,9	1,4	1,3
	ven.	17,6	13,8	0,8	1,8
4.WE.W.	art.	7,9	11,6	2,6	5,1
	ven.	15,7	7,5	1,3	2,2
5.LE.C.	art.	8,5	3,1	9,3	6,9
	ven.	6,3	3,5	12,1	9,8
6.KÖ.A.	art.	4,5	0,6	3,2	7,1
	ven.	6,7	2,4	3,5	2,3
7.RÖ.D.	art.	6,8	9,9	6,6	8,8
	ven.	15,1	5,4	6,5	5,3
8.DE.P.	art.	9,4	2,3	8,8	7,0
	ven.	9,2	5,6	11,4	6,7
9.RE.H.	art.	1,4	0,9	4,6	6,1
	ven.	7,0	0,7	8,5	5,6
10.MA.B.	art.	15,2	10,4	3,9	7,7
	ven.	8,8	3,2	5,9	7,4

Tabelle I:

Die Angabe erfolgte
x in 10^{-4} Mol/lme

Ammoniumwerte der gesunden Kontrollpersonen.

In den beiden linken Spalten sind die mit der enzymatischen Methode nach KIRSTEN u. Mitarb. vor und nach Belastung mit 5 g Ammoniumacetat ermittelten Werte aufgeführt. In den beiden rechten Spalten sind die analogen Werte, die nach der direkt colorimetrischen Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ ermittelt wurden, aufgezeichnet.

Normal-fälle		Methode Kirsten		Methode Beissenhirtz	
		vor Belastung	nach Belastung	vor Belastung	nach Belastung
arteriell	$\bar{x}$	8,8	7,4	5,3	6,1
	s	$\pm 3,9$	$\pm 5,1$	$\pm 2,8$	$\pm 2,1$
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 1,3$	$\pm 1,6$	$\pm 0,9$	$\pm 0,7$
venös	$\bar{x}$	11,4	6,5	6,1 ²	4,9
	s	$\pm 4,8$	$\pm 4,4$	$\pm 4,0$	$\pm 2,8$
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 1,5$	$\pm 1,4$	$\pm 1,3$	$\pm 0,9$

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

$s_{\bar{x}}$ = Standardabweichung
des Mittelwertes

Tabelle II:

Statistische Werte, die aus den ermittelten Ammonium-Konzentrationen der gesunden Kontrollpersonen errechnet wurden.

NAME		VOR BELASTUNG	NACH BELASTUNG
1.FR.W.	art.	32 mg%	61 mg%
	ven.	38 mg%	34 mg %
2.PO.L.	art.	24 mg%	24 mg %
	ven.	26 mg%	25 mg %
3.DÖ.I.	art.	30 mg%	31 mg%
	ven.	32 mg%	33 mg %
4.WE.W.	art.	28 mg %	36 mg %
	ven.	29 mg %	33 mg %
5.LE.C.	art.	23 mg %	33 mg %
	ven.	24 mg %	15 mg %
6.KÖ.A.	art.	43 mg %	49 mg %
	ven.	44 mg %	24 mg %
7.RÖ.D.	art.	39 mg %	31 mg %
	ven.	27 mg %	28 mg %
8.DE.P.	art.	35 mg %	40 mg %
	ven.	37 mg %	39 mg %
9.RE.H.	art.	22 mg %	27 mg %
	ven.	25 mg %	23 mg %
10.MA.B.	art.	40 mg %	46 mg %
	ven.	39 mg %	42 mg %

Tabelle III: Harnstoffwerte der gesunden Kontrollpersonen.
(Bestimmung nach FAWCETT und SCOTT.)

Tabelle IV:

Statistische Werte, die aus den ermittelten Harnstoffkonzentrationen der gesunden Kontrollpersonen errechnet wurden.

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

$s_{\bar{x}}$ = Standardabweichung des Mittelwertes.

Normal-fälle		Harnstoff	
		vor Belastung	nach Belastung
arteriell	$\bar{x}$	31,6	37,7
	s	$\pm 7,4$	$\pm 11,9$
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 2,3$	$\pm 3,6$
venös	$\bar{x}$	31,9	29,6
	s	$\pm 6,9$	$\pm 8,2$
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 2,2$	$\pm 2,6$

NAME	DIAGNOSE	EIWEISSBILD	BILIRUBIN	SGOT	SGPT	PROTHROMBIN	BROMTHALEIN	BIOPSIE
1 AL.H.	Cirrhose	29-5-7-11-48	1,5 mg%	37 U	20 U	58 %	—	—
2 EI.E.	Cirrhose	39-4-8-10-39	0,6 mg%	21 U	10 U	59 %	38 % R	+ Cirrhose
3 SA.A.	Cirrhose	36-5-7-8-44	50 mg%	52 U	13 U	72 %	51 % R	+ Cirrhose
4 SP.J.	Cirrhose	44-5-9-14-28	2,5 mg%	25 U	13 U	50 %	—	—
5 DO.G.	Cirrhose	44-5-6-7-38	4,0 mg%	56 U	15 U	48 %	66 % R	+ Cirrhose
6 BO.W.	chron. Hepatitis mit cirrh. Umbau	45-5-7-10-33	5,5 mg%	9 U	10 U	37 %	—	+ chron. Hepat.
7 KO.W.	Cirrhose	47-5-9-8-31	1,7 mg%	60 U	13 U	—	—	—
8 HE.H.	Cirrhose	46-7-11-16-20	1,5 mg%	33 U	14 U	90 %	—	+ Cirrhose
9 GE.J.	Cirrhose	51-5-7-12-26	2,9 mg%	45 U	56 U	60 %	22 % R	—
10 SÄ.Ö.	Cirrhose	40-5-7-14-34	2,6 mg%	47 U	16 U	80 %	—	—

Tabelle V: Diagnose und Ergebnisse der Leberfunktionsproben bei den untersuchten Kranken.

NAME		Methode KIRSTEN		Methode BEISSENHIRTZ	
		vor Belastung	nach Belastung	vor Belastung	nach Belastung
1.AL.H.	art.	15,4	32,8	16,7	49,6
	ven.	12,6	35,8	16,2	35,0
2.EI.E.	art.	19,3	62,6	9,4	41,9
	ven.	4,9	29,6	7,3	21,4
3.SA.A.	art.	8,5	24,0	6,8	16,4
	ven.	9,4	12,8	6,5	13,4
4.SP.J.	art.	20,8	41,9	12,7	31,9
	ven.	16,9	40,0	12,2	29,3
5.DO.G.	art.	12,4	34,0	13,2	30,0
	ven.	12,6	23,2	10,1	21,7
6.BOW.	art.	5,4	26,4	4,8	18,1
	ven.	5,6	20,3	3,7	10,3
7.KO.W.	art.	14,4	52,0	7,6	36,9
	ven.	9,1	35,6	6,9	26,5
8.HE.H.	art.	12,9	33,2	7,0	21,6
	ven.	11,0	27,2	6,0	16,3
9.GE.J.	art.	7,8	26,0	8,6	15,3
	ven.	8,8	12,8	4,4	8,6
10.SÄ.O.	art.	13,2	23,4	7,6	18,5
	ven.	7,1	21,6	14,5	14,8

Tabelle VI:

KONZENTRATIONEN IN
10⁻⁶ Mol/ml angegeben.

Ammoniumwerte der Kranken mit Lebercirrhose. *geben.*
In den beiden linken Spalten sind die mit der enzymatischen Methode nach KIRSTEN u. Mitarb. vor und nach Belastung mit Ammoniumacetat ermittelten Werte eingezeichnet. In den beiden rechten Spalten sind die analogen Werte, die nach der direkt colorimetrischen Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ ermittelt wurden, aufgeführt.

Tabelle VII:

Statistische Werte, die aus den ermittelten Ammoniumkonzentrationen der Kranken mit Lebercirrhose errechnet wurden.

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

$s_{\bar{x}}$ = Standardabweichung des Mittelwertes.

Leber- cirrhosen		Methode Kirsten		Methode Beissenhirtz	
		vor Belastung	nach Belastung	vor Belastung	nach Belastung
arteriell	$\bar{x}$	13,0	36,4	9,5	28,0
	s	$\pm 4,8$	$\pm 10,7$	$\pm 3,6$	$\pm 11,9$
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 1,5$	$\pm 3,4$	$\pm 1,2$	$\pm 3,7$
venös	$\bar{x}$	9,8	26,6	8,8	19,7
	s	$\pm 3,5$	$\pm 7,3$	$\pm 4,2$	$\pm 8,6$
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 1,1$	$\pm 2,3$	$\pm 1,3$	$\pm 2,7$

Harnstoff

Die bei der gleichen Personengruppe vor und nach Belastung mit Ammoniumacetat im venösen und arteriellen Blut gemessenen Harnstoffkonzentrationen sind in Tab. III aufgeführt. Die zugehörigen statistischen Werte (Mittelwert $\bar{x}$), Streuung (s) und Streuung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) sind in Tabelle IV aufgeführt.

Die statistische Untersuchung ergibt für die Harnstoffkonzentration vor und nach Ammoniumacetatbelastung keinen signifikanten Unterschied. Die Differenz zwischen der Harnstoffkonzentration im arteriellen und venösen Blut ist statistisch auffällig, die mittlere arterielle Konzentration ist dabei höher als die venöse.

2. Kranke mit LEBERCIRRHOSE

Es wurden 9 Kranke mit Lebercirrhose und 1 Kranker mit chronischer Hepatitis und cirrhotischem Umbau der Leber untersucht. Die Diagnose gründete sich auf die klinische Symptomatik und die Ergebnisse der Leberfunktionsproben. Bei 5 Kranken wurde die Diagnose biotisch gesichert.

Mit Ausnahme eines Kranken war der relative Anteil der β -Globuline im Serumgesamteiweiß in allen untersuchten Fällen erhöht. Auch die Aktivität der Serumglutamatoxalattransaminase war mit einer Ausnahme in allen Fällen über die Norm gesteigert. Bei 8 Kranken bestanden ausgeprägte Zeichen einer portalen Hypertension (Oesophagusvaricen, Ascites). Anamnestisch war bei 4 Kranken ein Alkoholabusus nachweisbar, bei zwei weiteren Kranken ergaben sich hierfür Verdachtsmomente. Die Diagnose und die Ergebnisse der Leberfunktionsproben sind in Tabelle V aufgeführt.

Ammonium

Die Ammoniumkonzentrationen, die bei den Kranken mit Lebercirrhose im arteriellen und venösen Blut jeweils vor und nach Belastung mit der enzymatischen Methode (KIRSTEN und Mitarb.) und mit der colorimetrischen Methode (MÜLLER-BEISSENHIRTZ und Mitarb.) bestimmt wurden, sind in Tabelle VI aufgeführt. Tabelle VII enthält für jede Untersuchungsgruppe und jede Methode die Mittelwerte ($\bar{x}$), die Streuung (s) und die Streuung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$).

Die statistische Prüfung ergibt, daß bei Kranken mit Lebercirrhose vor Belastung die Ammoniumkonzentration weder im arteriellen noch im venösen Blut

im Vergleich zu Gesunden signifikant erhöht ist. Dieser Befund ist unabhängig von der angewandten Bestimmungsmethode (enzymatische oder direkt colorimetrische Methode). Hingegen zeigt sich nach Ammoniumacetatbelastung bei den Kranken mit Lebercirrhose im Gegensatz zu den Gesunden ein hoch signifikanter Anstieg der Ammoniumkonzentration im arteriellen und venösen Blut.

Im arteriellen Blut erreicht die Ammoniumkonzentration nach Belastung signifikant höhere Werte als im venösen Blut, d. h. eine Wechselwirkung ist gesichert. Vor Belastung hingegen besteht bei den Kranken mit Lebercirrhose ebenso wie bei den Gesunden keine signifikante arterio-venöse Differenz der Ammoniumkonzentration. Die mit der enzymatischen Methode gemessenen Werte sind im Mittel höher als die mit der direkt colorimetrischen Methode ermittelten Werte. Dies trifft sowohl für die arteriell und venös gemessenen als auch für die Werte vor und nach Belastung zu. Der Vergleich der beiden Methoden ist in Abbildung 8 und in Abbildung 9 dargestellt.

Harnstoff

Die bei den Kranken mit Lebercirrhose im arteriellen und venösen Blutserum jeweils vor und nach Belastung gemessenen Harnstoffkonzentrationen sind in Tabelle VIII aufgeführt. Die für die einzelnen Untersuchungsgruppen berechneten Mittelwerte ($\bar{x}$), Streuung (s) und Streuung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) zeigt die Tabelle IX.

Die statistische Prüfung ergibt, daß bei den Kranken mit Lebercirrhose die Harnstoffkonzentration im arteriellen und venösen Blut vor und nach Belastung im Vergleich zu Gesunden nicht signifikant verändert ist. Auch eine signifikante arterio-venöse Differenz besteht nicht. Jedoch zeigt sich bei den Kranken mit Lebercirrhose sowohl im arteriellen als auch im venösen Blutserum beim paarweisen Vergleich eine geringe, aber signifikante Zunahme der Harnstoffkonzentration unter der Belastung mit Ammoniumacetat.

Die Ergebnisse sollen im folgenden nochmals zusammenfassend dargestellt werden:

A. Ammoniumkonzentration

1. Die mit der enzymatischen Methode gemessenen Ammoniumkonzentrationen im Blut sind höher als die mit der direkt-colorimetrischen Methode bestimmten. Der Unterschied der Ergebnisse der beiden Methoden ist bei den Kranken mit Lebercirrhose - und hier vor allem bei Zunahme der Ammoniumkonzentration unter Belastung - besonders deutlich (Tab. 2 und 7).

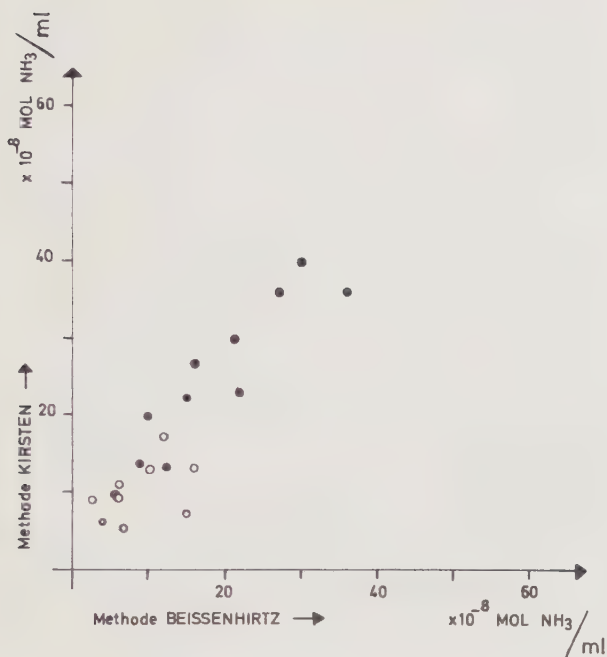


Abb. 8:

Gruppe der Kranken mit Lebercirrhose.

Es ist die Beziehung zwischen den nach beiden Methoden im venösen Blut ermittelten Ammoniumkonzentrationen dargestellt.

Auf der Abszisse ist die Ammoniumkonzentration, die mit der direkt colorimetrischen Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ ermittelt wurde, aufgetragen, auf der Ordinate diejenigen Werte, die mit der enzymatischen Methode nach KIRSTEN u. Mitarb. gefunden wurden.

Die Konzentrationen, die nach der Ammoniumacetatbelastung gefunden wurden, sind als schwarze Wertepunkte eingezeichnet.

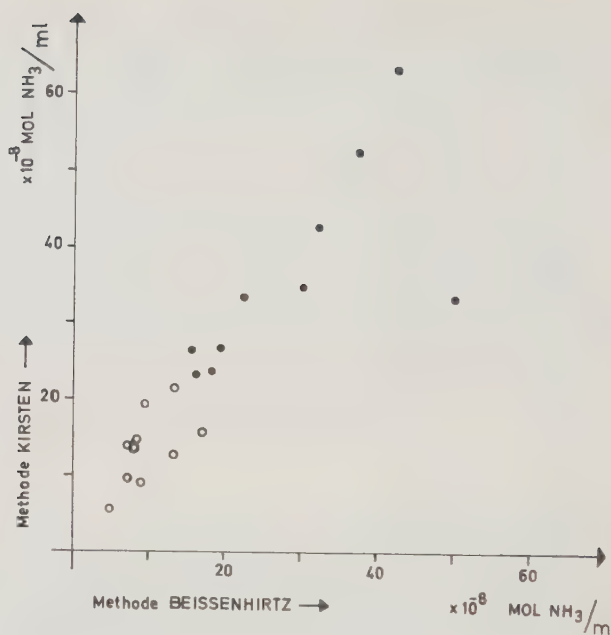


Abb. 9:

Die Darstellung entspricht der vorangegangenen. Es handelt sich um die Ammoniumkonzentrationen im arteriellen Blut.

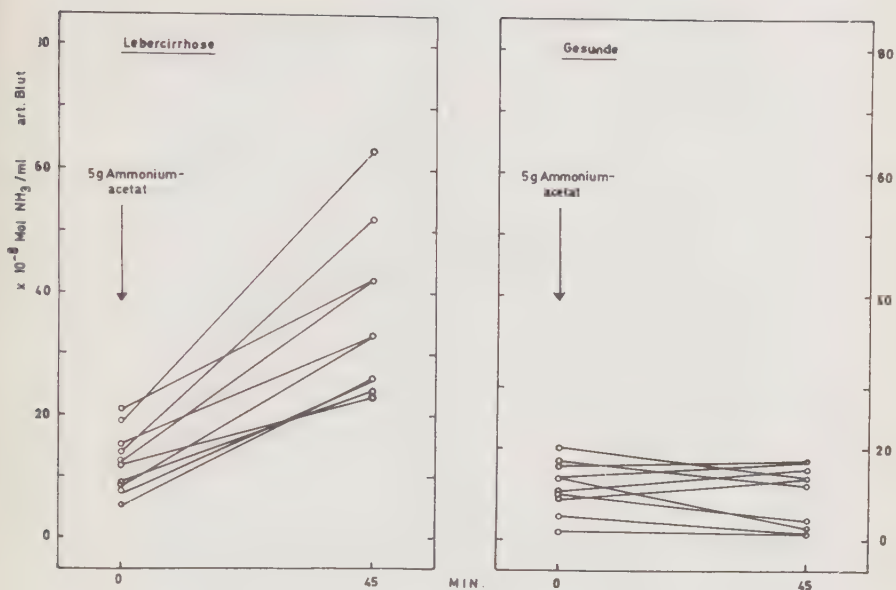


Abb. 10:

In der linken Zeichnung ist der Anstieg der Einzelwerte der Kranken mit Lebercirrhose unter der Belastung graphisch dargestellt. In der rechten Spalte ist das Verhalten der Ammoniumkonzentration der einzelnen gesunden Kontrollpersonen unter der Belastung dargestellt.

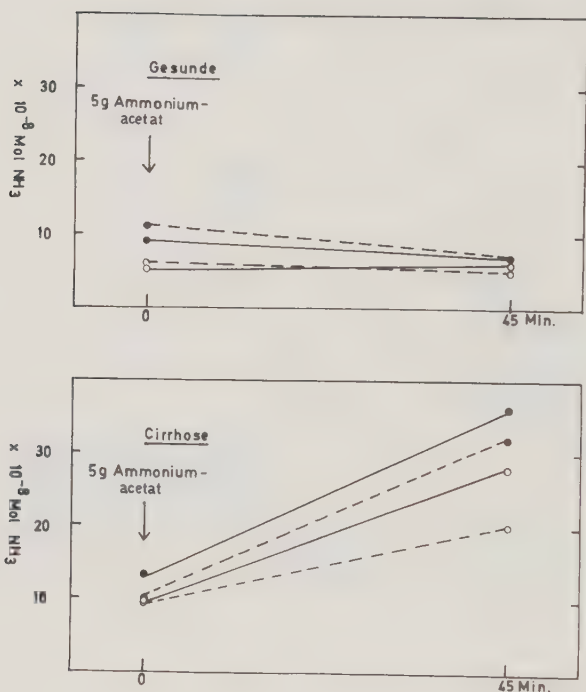


Abb. 11:

Graphische Darstellung der Mittelwerte der Ammoniumkonzentration unter der Belastung.

- — ● = arterielle Werte
 - - - - ● = venöse Werte
 - — ○ = arterielle Werte
 - - - - ○ = venöse Werte
- enzymatische Methode
- direkt colorimetrische Methode

NAME		VOR BELASTUNG	NACH BELASTUNG
1. ALH.	art.	42 mg %	44 mg %
	ven.	46 mg %	51 mg %
2. E. E.	art.	33 mg %	34 mg %
	ven.	33 mg %	34 mg %
3. SA. A.	art.	32 mg %	34 mg %
	ven.	33 mg %	31 mg %
4. SP. J.	art.	55 mg %	60 mg %
	ven.	53 mg %	60 mg %
5. D. G.	art.	21 mg %	24 mg %
	ven.	23 mg %	23 mg %
6. B. W.	art.	36 mg %	36 mg %
	ven.	35 mg %	37 mg %
7. K. W.	art.	52 mg %	56 mg %
	ven.	51 mg %	55 mg %
8. H. E. H.	art.	34 mg %	53 mg %
	ven.	36 mg %	39 mg %
9. G. E. J.	art.	37 mg %	36 mg %
	ven.	34 mg %	41 mg %
10. S. A. O.	art.	32 mg %	34 mg %
	ven.	34 mg %	33 mg %

Tab. VIII:

Harnstoffwerte der Kranken mit Lebercirrhose.

Tabelle IX:

Statistische Werte, die aus den ermittelten Harnstoffkonzentrationen der Kranken mit Lebercirrhose errechnet wurden.

$\bar{x}$ = Mittelwert

s = Standardabweichung

$s_{\bar{x}}$ = Standardabweichung des Mittelwertes

Leber- cirrhosen		HARNSTOFF	
		vor Belastung	nach Belastung
arteriell	$\bar{x}$	37,5	41,2
	s	$\pm 9,9$	$\pm 11,6$
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 3,2$	$\pm 3,7$
venös	$\bar{x}$	37,9	40,4
	s	$\pm 9,2$	$\pm 11,7$
	$s_{\bar{x}}$	$\pm 2,9$	$\pm 3,7$

2. Bei Gesunden ist weder vor noch nach Belastung eine signifikante arterio-venöse Differenz der Ammoniumkonzentration nachweisbar. Auch bei den Kranken mit Lebercirrhose ist diese Differenz vor der Belastung nicht nachweisbar, hingegen besteht eine ausgeprägte arterio-venöse Differenz der Ammoniumkonzentration nach Ammoniumacetatbelastung.
3. Zwischen der arteriellen Ammoniumkonzentration bei Gesunden und Kranken mit Lebercirrhose besteht jeweils ohne Ammoniumacetatbelastung keine signifikante Differenz. Gleiches gilt für die Ammoniumkonzentration im venösen Blut vor der Ammoniumacetatbelastung.
4. Die Ammoniumacetatbelastung führt bei Gesunden zu keiner signifikanten Zunahme der Ammoniumkonzentration im arteriellen und venösen Blut. Hingegen hat die Belastung bei den Kranken mit Lebercirrhose eine signifikante Zunahme der Ammoniumkonzentration zur Folge (Abb.10). Sie ist im arteriellen Blut stärker ausgeprägt als im venösen (Abb.11), die Wechselwirkung ist gesichert.

B. Harnstoffkonzentration

1. Weder bei den Gesunden noch bei den Kranken mit Lebercirrhose besteht eine signifikante arterio-venöse Differenz der Harnstoffkonzentration.
2. Die Harnstoffkonzentration im arteriellen Blutplasma bei Kranken mit Lebercirrhose unterscheidet sich nicht signifikant von derjenigen bei Gesunden. Gleiches gilt für die venöse Harnstoffkonzentration.
3. Die Ammoniumacetatbelastung führt bei Kranken mit Lebercirrhose im Gegensatz zu Gesunden sowohl im arteriellen als auch im venösen Blut zu einer geringen, im paarweisen Vergleich signifikanten Zunahme der Harnstoffkonzentration. Beim Mittelwertsvergleich der Harnstoffkonzentration nach Belastung bei Kranken mit Lebercirrhose einerseits und Gesunden andererseits ist jedoch eine signifikante Differenz nicht nachweisbar.

V. DISKUSSION

Die mitgeteilten Ergebnisse sollen unter drei Gesichtspunkten diskutiert werden:

1. Methodik der Ammoniumbestimmung im Blut.

2. Ammoniumkonzentration bei Gesunden und Leberkranken. Arterio-venöse Differenz der Ammoniumkonzentration.
3. Wirkung der Ammoniumacetatbelastung auf die Ammonium- und Harnstoffkonzentration im Blut bei Gesunden und Leberkranken.

Zu 1.:

Seit man die Bedeutung der Ammoniumkonzentration bei physiologischen und pathologischen Stoffwechselvorgängen erkannt hat, sind zahlreiche Methoden zur Bestimmung der Ammoniumkonzentration entwickelt worden. Die Vielzahl der mitgeteilten Methoden, die sich oft nur durch geringfügige Modifikationen unterscheiden, lassen sich im wesentlichen in zwei Gruppen einteilen:

- I. Methoden mit vorausgehender Isolierung des Ammoniaks oder Ammoniums.
- II. Methoden mit direkter Bestimmung der Ammoniumkonzentration im enteiweißten Blut.

Die Isolierung des Ammoniumions oder Ammoniaks erfolgt durch Destillation (Übersicht bei STANOJEVIC), Diffusion (CONWAY) oder Adsorption (DIENST, FORMAN). Nach der Isolierung wird Ammonium im Destillat oder Eluat durch colorimetrische Verfahren oder titrimetrisch bestimmt. Der Ammoniumisolierung durch Diffusion haftet der Nachteil an, daß beim erforderlichen stark alkalischen pH verschiedene im Blut enthaltene Substanzen, besonders Glutamin und Adenin, unter Ammoniumbildung spontan zerfallen. Da die Konzentration von Glutamin um etwa 2 Größenordnungen höher ist als die von Ammonium, führt bereits ein geringer Zerfall von Glutamin zu einer excessiven Zunahme der Ammoniumkonzentration. Die Meßresultate werden dadurch verfälscht. Diesen Nachteil versuchen einige Autoren zu umgehen, indem die Ammoniumkonzentration nach verschieden langer Diffusionszeit und Extrapolation auf den Wert 0 ermittelt wird. Jedoch ist eine solche Extrapolation mit zahlreichen Fehlermöglichkeiten behaftet. Wir haben deshalb auf Anwendung von Diffusionsmethoden zur Ammoniumbestimmung verzichtet. Der gleiche Nachteil betrifft auch die Destillationsmethoden, wenn die Destillation - was meist der Fall ist - im alkalischen Bereich erfolgt. Neuerdings haben WACHSMUTH und FRITZE ein Verfahren mitgeteilt, bei dem NH_3 durch Wasserdampfdestillation bei pH 7,5 isoliert wird.

Unter diesen Bedingungen erfolgt keine Spaltung (Säureamidhydrolyse) des Glutamins. Die Empfindlichkeit des Verfahrens konnte jedoch nicht soweit gesteigert werden, daß die Bestimmung der Ammoniumkonzentration im Blut möglich ist.

Ammoniumbestimmungen durch Isolierung an Ionenaustauschern wurden in die vorliegende Untersuchung nicht mit einbezogen. Wir haben uns in der vorliegenden Untersuchung auf Methoden der Ammoniumbestimmung beschränkt, bei denen Ammoniumionen oder Ammoniak nicht isoliert werden:

- a) Direkte colorimetrische Methode nach MÜLLER-BEISENHIRTZ
 - b) Enzymatische Methode nach KIRSTEN und Mitarb.
- a) Bei dem erstgenannten Verfahren wird Ammonium mit Hilfe der Hypochloritreaktion direkt im enteweißten Blut bestimmt. Das Verfahren ist einfach und rasch durchführbar, so daß Nebenreaktionen, die zu einer Erhöhung der Ammoniumkonzentration führen, nicht ins Gewicht fallen. Der Nachteil des Verfahrens ist, daß die Phenol-Hypochloritreaktion nicht streng spezifisch für Ammonium ist, sondern auch andere Substrate (Aminosäuren, Amine u. a.) einen blauen Farbstoff ergeben.
- b) Beim zweiten Verfahren wird das Ammoniumion durch eine enzymatische Reaktion quantitativ bestimmt. Der Vorteil dieser Methode liegt in ihrer großen Spezifität. Allerdings wird bei der Enteweißung mit Trichloressigsäure zusätzlich Ammonium gebildet werden, da die Aufbereitung bis zum enzymatischen Test länger dauert als bei der direkt colorimetrischen Methode. Es können dadurch Nebenreaktionen mit Ammoniumprodukten stärker ins Gewicht fallen.

Die bei Gesunden mit der direkt-colorimetrischen Methode gemessenen Werte der Ammoniumkonzentration sind gering höher als die von MÜLLER-BEISENHIRTZ angegebenen Normalwerte. Der Mittelwert der Ammoniumkonzentration bei der von uns untersuchten Kontrollgruppe beträgt $74 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$, während MÜLLER-BEISENHIRTZ bei Gesunden als Mittelwert $47 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$ und als Normbereich $32 - 85 \mu\text{g NH}_3\text{-N}/100 \text{ ml}$ angeben.

Auch die mit der enzymatischen Methode bei Gesunden im Rahmen unserer Untersuchungsreihe ermittelten Werte sind höher als die in der Originalarbeit . mitgeteilten:

Wir finden einen Mittelwert von $8,8 \cdot 10^{-8} \text{ MOL/ml}$, während KIRSTEN und Mitarb. den Ammoniakgehalt im Nüchternblut mit Werten unter $4 \cdot 10^{-9} \text{ MOL/ml}$ angeben, bei den nicht nüchternen Versuchspersonen fanden sie dagegen $5 \cdot 10^{-8} \text{ MOL/ml}$ und nach Muskelarbeit $10 \cdot 10^{-8} \text{ MOL/ml}$. Diese Unterschiede wurden bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Insgesamt sind sowohl bei Gesunden wie auch bei Cirrhosekranken die mit der enzymatischen Methode erhaltenen Werte höher als die bei der direkt-colori-

metrischen Methode. Dies ist besonders auffallend, denn die enzymatische Methode besitzt eine größere Spezifität als die direkt colorimetrische. Der Unterschied ist nur dadurch zu erklären, daß im stark sauren Milieu bei der Enteiweißung Substanzen im Blutserum zusätzlich Ammonium bilden und daß dieser Zuwachs zum "endogenen Ammonium" beim längeren Aufarbeitungsvorgang der enzymatischen Methode größer ist als bei dem sehr rasch durchführbaren direkt-colorimetrischen Verfahren.

Zu 2.:

Unsere Untersuchungen ergeben, daß bei Gesunden keine arterio-venöse Differenz der Ammoniumkonzentration besteht. Auch bei den Kranken mit Lebercirrhose ist ohne Ammoniumacetatbelastung keine Differenz der arteriellen und venösen Ammoniumkonzentration nachweisbar. Die arterio-venöse Differenz wird bei dieser Krankengruppe erst unter der Ammoniumacetat-Gabe deutlich. Ursache für die arterio-venöse Differenz der Ammoniumkonzentration bei Leberkranken unter Ammoniumacetatbelastung ist vorwiegend die Zunahme der arteriellen Ammoniumkonzentration. Ammonium wird im Darm, in der Niere und in der Muskulatur gebildet. Eine Mehrproduktion von Ammonium in Niere und Muskulatur wird primär den venösen Spiegel erhöhen, eine Mehrbildung von Ammonium im Darm und eine verminderte Ammoniumentgiftung in der Leber bewirken hingegen, daß Ammonium von der Pfortader vermehrt in die untere Hohlvene und in das arterielle Blut gelangt.

Nach peroraler Gabe von Ammoniumacetat, also unter Bedingungen mit vermehrtem Ammoniumangebot an die Leber und vermehrter Beanspruchung der Ammoniumentgiftung steigt die arterielle Konzentration stärker an als die venöse. Diese Zunahme der arteriellen Ammoniumkonzentration bedingt die signifikante arterio-venöse Differenz, die damit einen Hinweis auf die verminderte Entgiftungsfunktion der Leber für Ammonium gibt.

Zu 3.:

Belastungen mit Ammoniumsalzen sind verschiedenen Autoren (STAHL; MARTINI; weitere Literatur ist dort aufgeführt) durchgeführt worden. Es ist wichtig, hierbei nicht Ammoniumchlorid zu verwenden, da hierdurch eine Acidose ausgelöst und Änderungen der Ammoniumausscheidung und der Ammoniumverteilung zwischen intra- und extrazellulärem Raum verursacht werden.

Bei den von uns untersuchten gesunden Personen führt die Ammoniumacetatbelastung zu keiner Zunahme der arteriellen und venösen Ammoniumkonzentration. Ammonium nimmt sogar unter der Belastung gering ab. Das nach der enteralen Resorption mit der Pfortader der Leber zugeführte Ammonium wird offenbar vollständig durch die Harnstoffsynthese oder durch Glutaminbildung

entgiftet. Eine Zunahme der Harnstoffkonzentration tritt nicht auf, da Harnstoff rasch durch die Niere eliminiert werden kann.

Bei den Kranken mit Lebercirrhose führt hingegen die Belastung mit Ammoniumacetat zu einer signifikanten Zunahme der Ammoniumkonzentration auf das 2 - 3fache des Ausgangswertes. Die Ammoniumkonzentration steigt dabei im arteriellen Blut stärker an als im venösen. Ursache dieses Effektes der Ammoniumbelastung ist die Ausbildung portocavaler Anastomosen, die das Pfortaderblut unter Umgehung der Leber direkt in die Hohlvene leiten und damit das enteral gebildete Ammonium den Entgiftungsmechanismen in der Leber vorenthalten. Bei Blutungen in den Verdauungskanal mit besonders starker enteraler Ammoniumbildung kann deshalb das Verhalten der Ammoniumkonzentration differential-diagnostische Aufschlüsse über die Blutungsquelle geben. Eine erhöhte Ammoniumkonzentration weist auf portocavale Anastomosen und damit auf eine Oesophagusvarizenblutung hin, während eine normale Ammoniumkonzentration bei anderen Blutungsquellen (Ulcus, Tumor) beobachtet wird (MARTINI). Aber auch wenn portocavale Anastomosen fehlen oder gering ausgeprägt sind, kann die Ammoniumentgiftung bei Lebercirrhose eingeschränkt sein. Untersuchungen über die am Harnstoffcyclus beteiligten Metaboliten zeigen nämlich, daß bei Erkrankungen des Leberparenchyms eine Störung im Harnstoffcyclus besteht, insofern als die Umwandlung von Citrullin in Arginin eingeschränkt ist. Beide Vorgänge - Umgehung der Leber durch portocavale Anastomosen und Störung der Entgiftung im Harnstoffcyclus - verursachen den Anstieg der Ammoniumkonzentration nach Ammoniumbelastung bei Leberkranken. Da die Niere Ammonium über den Urin ausscheidet und dadurch die Konzentration im Nierenvenenblut sinkt, ist unter Ammoniumbelastung die Zunahme der arteriellen Ammoniumkonzentration stärker als die der Konzentration im venösen Blut.

Die Zunahme der Harnstoffkonzentration unter Ammoniumbelastung bei Kranken mit Lebercirrhose ist wahrscheinlich auf eine geringe Einschränkung der renalen Harnstoffexkretion (verminderte glomeruläre Filtration bei Volumenmangel) zurückzuführen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

1. Bei 10 Gesunden und 10 Kranken mit Lebercirrhose werden die Ammoniumkonzentrationen im arteriellen und venösen Vollblut sowie die Harnstoffkonzentrationen im arteriellen und venösen Blutserum bestimmt. Die Be-

stimmungen werden bei jeder Versuchsperson vor und nach 45 Minuten nach peroraler Gabe von 5 g Ammoniumacetat durchgeführt ("Ammoniumbelastung").

2. Harnstoff wird mit der Urease-Methode nach FAWCETT und SCOTT bestimmt. Die Ammoniumkonzentration wird am Trichloressigsäure-Filtrat des frisch entnommenen Blutes mit der direkt colorimetrischen Methode nach MÜLLER-BEISSENHIRTZ und parallel mit der enzymatischen Methode nach KIRSTEN und Mitarb. bestimmt. Die mit der enzymatischen Methode gemessenen Werte sind höher als die mit der direkt colorimetrischen Methode bestimmten. Die Ursachen für diese Differenz sowie Vor- und Nachteile der beiden angewandten Methoden werden diskutiert.
3. Bei Gesunden besteht keine arterio-venöse Differenz weder für die Ammonium- noch für die Harnstoffkonzentration. Bei Kranken mit Lebercirrhose ist eine signifikante arterio-venöse Differenz der Ammoniumkonzentration unter Ammoniumacetatbelastung nachweisbar. Eine arterio-venöse Differenz der Harnstoffkonzentration liegt bei Kranken mit Lebercirrhose nicht vor.
4. Die Ammoniumkonzentration im Blut bei Lebercirrhose unterscheidet sich nicht signifikant von der bei Gesunden. Dies trifft sowohl für die arteriellen als auch für die venösen Konzentrationen zu.
5. Die Ammoniumacetatbelastung führt bei Gesunden zu keiner signifikanten Steigerung der arteriellen und venösen Ammoniumkonzentration. Auch die Harnstoffkonzentration ändert sich nicht signifikant. Hingegen ist bei Kranken mit Lebercirrhose nach Belastung die arterielle und venöse Ammoniumkonzentration sowohl im Vergleich zum Ausgangswert vor Belastung, wie auch im Vergleich zu Gesunden unter gleicher Belastung signifikant erhöht. Im arteriellen Blut ist die Ammoniumzunahme stärker als im venösen Blut.

Die Harnstoffkonzentration steigt bei den Cirrhosekranken unter Ammoniumbelastung ebenfalls arteriell und venös gering an.
6. Die Ursache der arterio-venösen Differenz und der Zunahme der Ammoniumkonzentration bei Kranken mit Lebercirrhose unter der Belastung werden diskutiert. Beide Befunde sind wahrscheinlich auf eine verminderte Ammoniumentgiftung in der Leber infolge portocavaler Anastomosen und Störung der intrahepatischen Stoffwechselvorgänge (Harnstoffcyclus) zurückzuführen.

VII. LITERATUR

- BARAK, A. J., F. L. HUMOLLER, D. J. MAHLER und J. M. HOLTHAUS: The effect of arginine and glutamate on ammonia tolerance. *Gastroenterology* 43, 35 (1962)
- BORSOOK, H.: Micromethods for determination of ammonia, urea, total nitrogen, uric acid, creatine and allantoin. *J. Biol. Chem.* 110, 481 (1935)
- BORSOOK, H., J. W. DUBNOFF: The conversion of citrulline to arginine in kidney. *J. Biol. Chem.* 141, 717 (1941)
- BORSOOK, H., J. W. DUBNOFF: Ornithine-catalyzed urea formation in liver homogenate. *J. Biol. Chem.* 169, 461 (1947)
- BROWN, G. W. jr., P. P. COHEN: Comparative biochemistry of urea synthesis. *J. Biol. Chem.* 234, 1769 (1959)
- BROWN, G. W., P. P. COHEN: Comparative biochemistry of urea synthesis. *Biochem. J.* 75, 82 (1960)
- COHEN, P. P., M. HAYANO: The enzymatic steps in urea synthesis. *J. Biol. Chem.* 172, 405 (1948)
- CONWAY, E. J., R. COOKE: Blood ammonia. *Biochem. J.* 33, 457 (1939)
- CONWAY, E. J.: Microdiffusion analysis and volumetric error. 4th revised edit. London Crosby Lockwood & Ltd. 1957
- COLOMBA, J. P., R. RICHTERICH, A. DONATH, A. SPAHR, E. ROSSI: Congenital lysine intolerance with periodic ammonia intoxication. *Lancet* 9, 1014 (1964)
- DASTUR, D. K., R. SESHADRI, V. R. TALAGERI: Liverbrain relationships in hepatic coma with special reference to ammonia and keto acid metabolism. *Arch. Int. Med.*, Chicago 112, 899 (1963)
- DAVISON, D. C., W. H. ELLIOT: Enzymic reaction between arginine and fumarate in plant and animal tissues. *Nature* 169, 313 (1952)
- DIENST, S. G.: Treatment of progressive ammonia intoxication by exclusion of the colon. *N. England J. Med.* 270, 555 (1964)
- DIENST, S. G.: An ion exchange method for plasma ammonia concentration. *J. Lab. Clin. Med.* 58, 149 (1961)
- EGENSE, J.: Ammonia and hepatic coma. *Acta Med. Scand.* (Stockholm) 173, 7 (1963)

- FAWCETT, J. K., J. E. SCOTT: A rapid and precise method for determination of urea.
J. Clin. Path. 13, 156 (1960)
- FLORES, G., A. ROSADO, J. TORRES, G. SOBERON: Liver enzyme activities in ammonia fixation by the rat.
Amer. J. Physiol. 203, 43 (1962)
- FOLIN, O., W. DENIS: New methods for the determination of total N.P.N., urea and ammonia in blood.
J. Biol. Chem. 11, 527 (1912)
- FORSTER, C. L., R. SCHÖNHEIMER, D. RITTENBER: The utilization of ammonia for amino acid and creatinine formation in animals.
J. Biol. Chem. 127, 319 (1937)
- FORMAN, D. T.: Rapid determination of plasma ammonia by an ion exchange technic. Clin. Chem. 10, 496 (1964)
- FÜRTH, A., A. FRIEDRICH, R. SCHOLL: Über eine Farbreaktion des Glykolls und anderer Aminosäuren mit Natriumhypochlorit und Phenol.
Biochem. Z. 240, 50 (1931)
- GRISOLIA, S., P. P. COHEN: Catalytic role of glutamate derivatives in citrulline biosynthesis.
J. Biol. Chem. 204, 753 (1953)
- HAEFELY, W., A. HÜRLIMANN, H. STAUB: Zur Pathophysiologie des Ammoniakstoffwechsels. Bedeutung der bakteriellen Ureasewirkung im Intestinaltrakt für Hyperammonämie bei portocavalem Shunt.
Med. Klin. 17, 696 (1962)
- HALL, L. M., P. P. COHEN: Stimulation of carbamylphosphate synthesis by a factor isolated from liver.
Federation Proc. 15, 266 (1956)
- HOBERMAN, H. D., E. A. HAVIR, O. ROCHOVANSKY, S. RATNER: Biosynthesis of urea. X. Stereospecificity of the argininosuccinase reaction. J. Biol. Chem. 239, 3818 (1964)
- HUMOLLER, F. L., A. J. BARAK, J. M. HOLTHAUS: Distribution of ammonia in cells and plasma.
Clin. Chem. 10, 589 (1964)
- JACOBS, M. H.: Some aspects of cell permeability to weak electrolytes. Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 8, 30 (1940)
- JONES et al.: Carbamylphosphate, the carbamyl donor in enzymatic citrulline synthesis.
J. Amer. Chem. Soc. 77, 819 (1955)

- KENNAN, A. L.: Effect of insulin on glutamine synthetase activity in rat liver. *Endocrinology*, 74, 518 (1964)
- KIRSTEN, E., C. GEREZ, R. KIRSTEN: Eine enzymatische Mikrobestimmung des Ammoniaks geeignet für Extrakte tierischer Gewebe und Flüssigkeiten. *Biochem. Z.* 337, 312 (1963)
- KOLLER, S.: Statistische Auswertungsmethoden, in Rauen, *Biochem. Taschenbuch*, Berlin-Göttingen-Heidelberg 1964 II
- KONITZER, K., S. VOIGT: Direct determination on ammonium in blood and tissue extracts by means of phenol-hypochlorite reaction. *Clin. Chem. Acta* 8, 5 (1963)
- KREBS, H. A., H. HENSELEIT: Untersuchung über die Harnstoffbildung im Tierkörper. *Z. Physiol. Chem.* 210, 33 (1932)
- KREBS, H. A.: Urea formation in mammalian liver. *Biochem. J.* 36, 758 (1942)
- MARTINI, G. A.: Die Bedeutung des Blutammoniaks für die Entstehung des Lebercomas. *Dtsch. med. Wschr.* 86, 1351 (1961)
- MARTINI, G. A., E. A. PHEAR, E. RUEBNER, S. SHERLOCK: The bacterial content of the small intestine in normal and cirrhotic subjects: Relation to methionine toxicity. *Clin. Sci.* 16, 35 (1957)
- MCLEAN, P., MCGURNEY, M.: Effect of adrenalectomy and of growth hormone on enzymes concerned with urea synthesis in rat liver. *Biochem. J.* 87, 96 (1963)
- MEISTER, A.: *Biochemistry of Amino acids.* Academ. Press. New York 1957
- MILLER, G. E. und J. D. RICE: Determination of the concentration of ammonia nitrogen in plasma by means of a simple ion exchange method. *Amer. J. Clin. Path.* 39, 97 (1963)
- MOORE, E. W., G. W. STROHMEYER, T. C. CHALMERS, J. K. RASMUSSEN, S. J. GORDON: Distribution of ammonia across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *Amer. J. Med.* 35, 350 (1963)
- MUFTIC, M. K.: A new phenol-hypochlorite reaction for ammonia. *Nature (Lond.)* 201, 622 (1964)
- MÜLLER-BEISENHIRTZ, W., H. KELLER: Zur Bestimmung des Blutammoniaks. *Klin. Wschr.* 43, 43 (1965)
- NAZARIO, M., P. P. COHEN: Effect of thyroxin enzymes of the urea cycle in regenerating rat liver. *Proc. soc. Exp. Biol. Med. N. Y.* 106, 492 (1961)

- PARNAS, J. K., J. HELLER: Über den Ammoniakgehalt und über die Ammoniakbildung im Blute. *Biochem. Z.* 152, 1 (1924)
- PETRACK, B., S. RATNER: Biosynthesis of urea. VII Reversible formation of argininosuccinic acid. *J. Biol. Chem.* 233, 1494 (1958)
- PITTS, R. F. et al.: Renal production and excretion of ammonia. *Amer. J. Med.* 36, 720 (1964)
- RATNER, S.: Urea synthesis and metabolism of arginine and citrulline. *Advances Enzymol.* 15, 319 (1954)
- REICHEL, K. L., E. KVAMME, B. TWEIT: The enzymatic determination of ammonia in blood and tissues. *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 16, 433 (1964)
- RUSSEL, J. A.: The colorimetric estimation of small amounts of ammonia by phenol-hypochlorite reaction. *J. Biol. Chem.* 156, 457 (1944)
- SCHIMKE, R. T.: Adaptive characteristics of urea cycle enzymes in the rat. *J. Biol. Chem.* 237, 459 (1961)
- SCHIMKE, R. T.: Differential effects of fasting and protein-free diets on levels of urea cycle enzymes in rat liver. *J. Biol. Chem.* 237, 1921 (1962)
- SELIGSON, D., K. HIRAHARA: The measurement of ammonia in whole blood, erythrocytes and plasma. *J. Lab. Clin. Med.* 49, 962 (1957)
- SLYKE, B. D. van, A. HILLER: Determination of ammonia in blood. *J. Biol. Chem.* 102, 449 (1933)
- STAHL, J.: Arterielle und venöse Blutammoniakstudien bei Leberkrankheiten. *Dtsch. med. J.* 10, 325 (1959)
- STAHL, J.: Studies of blood ammonia in liver disease, its diagnostic, prognostic and therapeutic significance. *Ann. Intern. Med.* 58, 1 (1963)
- TALKE, H., G. E. SCHUBERT: Enzymatische Harnstoffbestimmung in Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. *Klin. Wschr.* 43, 174 (1965)
- TERNBERG, J. L., F. B. HERSHEY: Colorimetric determination of blood ammonia. *J. Lab. Clin. Med.* 56, 766 (1960)
- VITTI, T. G., O. H. GAEBLER: Effects of growth hormone on metabolism of nitrogen from several amino acids and ammonia. *Arch. Biochem. Biophys.* 101, 292 (1963)
- WACHSMUTH, E. D., J. FRITZE: Eine einfache Methode zur Bestimmung von Ammoniak in nicht enteiweißter Lösung. *Klin. Wschr.* 43, 53 (1965)

WEIL-MALHERBE, H.: Significance of glutamic acid for the metabolism of nervous tissue.

Physiol. Rev. 30, 549 (1950)

ZÖLLNER, N., P. BIRK: Die Bestimmung der Blutammoniaks und ihre Ergebnisse bei Leberkrankheiten.

Klin. Wschr. 36, 570 (1958)

Herrn Professor Dr. W. Gerok möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und für die zahlreichen Anregungen und Hinweise bei der Durchführung der Arbeit meinen aufrichtigsten Dank aussprechen.

Herrn Doktor Dudeck danke ich für seine freundliche Hilfe bei der statistischen Auswertung der experimentellen Ergebnisse.

LEBENS LAUF

- | | |
|--|--|
| Am 17. März 1940
die Eltern sind | wurde ich in Mannheim geboren,
Bruno und Elisabeth Fey,
geb. Rittel. |
| Ab Herbst 1946
von Ostern 1954

im März 1960 | besuchte ich die Grundschule in Saarbrücken,
bis Ostern 1960 besuchte ich das Aufbaugymnasium
in Bensheim/Bergstraße und bestand
an dieser Schule die Reifeprüfung. |
| Ab Sommersemester

im April 1961 | 1960 bis einschließlich Wintersemester 1961/62
studierte ich an der Universität des Saarlandes in
Saarbrücken und Homburg/Saar Medizin,
bestand ich die ärztliche Vorprüfung - naturwissen-
schaftlicher Teil - an der Universität des Saarlandes. |
| Im Sommersemester

im April 1963
im Juli 1966 | 1962 setzte ich das Medizinstudium an der Johannes
Gutenberg-Universität in Mainz fort und bestand
die ärztliche Vorprüfung - medizinischer Teil - und
das medizinische Staatsexamen an dieser Universität. |
| Von September | 1966 bis zum 31. Mai 1967 war ich an der Universi-
täts-Nervenlinik in Mainz als Medizinalassistentin
tätig. |

